

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 609 437**

51 Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.10.2011 PCT/IB2011/002680**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.04.2012 WO12046139**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.10.2011 E 11801821 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.10.2016 EP 2625527**

54 Título: **Método para evaluar la eficacia de una terapia con células T1 en un sujeto**

30 Prioridad:

08.10.2010 US 391133 P
08.10.2010 EP 10368038

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.04.2017

73 Titular/es:

TXCELL (100.0%)
Les Cardoulines Allée de la Nertière Sofia
Antipolis
06560 Valbonne, FR

72 Inventor/es:

FOUSSAT, ARNAUD y
QUATANNENS, BRIGITTE

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 609 437 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para evaluar la eficacia de una terapia con células T1 en un sujeto

Campo de la invención

5 La invención se refiere a un método para evaluar si un paciente humano sometido a una terapia con células Tr1 específica de antígeno tiene una probabilidad superior al 50% de responder al tratamiento, comprendiendo dicho método:

10 - determinar in vitro la proliferación específica de antígeno de células T contenidas en una muestra de células obtenida de dicho paciente entre el día 8 y el día 30 después de la última administración de la terapia con células Tr1 específica de antígeno, en donde dicha proliferación específica de antígeno es específica del antígeno para el cual están dirigidas las células Tr1,

15 - comparar dicha proliferación específica de antígeno de células T con una referencia estándar en donde la referencia estándar es la proliferación específica de antígeno de células T contenida en una muestra obtenida de dicho paciente antes de la terapia con células Tr1 específica de antígeno, en donde dicha proliferación específica de antígeno es medida in vitro y es específica para el antígeno para el cual están dirigidas las células Tr1, determinando así si el paciente tiene una probabilidad superior al 50% de responder a dicha terapia con células Tr1 específica del antígeno.

Antecedentes de la invención

20 El tratamiento de una enfermedad o una condición con un compuesto biológico presenta una serie de desafíos. Uno de ellos es determinar qué población de pacientes es elegible para un tratamiento particular, qué sujetos van a responder a este tratamiento y qué sujetos perderán la respuesta después de una cierta cantidad de tiempo. Esta información tiene impactos significativos en el cuidado del paciente y diseños de estudios clínicos.

Los biomarcadores suelen ayudar a responder a estas preguntas.

Un biomarcador puede definirse como "una característica que se mide y evalúa objetivamente como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patogénicos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica".

25 En la técnica, un gran número de estudios describen el uso de moléculas tales como citoquinas o el uso de perfiles de expresión génica para determinar si el sujeto tratado va a ser o no un respondedor para el tratamiento.

30 Por ejemplo, se han descrito como biomarcadores moléculas tales como CRP y citoquinas tales como IL-1 beta, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12 o interferón gamma para definir la respuesta de sujetos con enfermedad de Crohn a infliximab y otros compuestos biológicos. WO2008/147869 describe la determinación de al menos una expresión génica entre IP-10, MCP-1, MMP-9, TNF alfa, EGF, IL-6, ENA-78, MPO, MIP-1 beta y VEGF para evaluar la eficacia de un tratamiento para trastornos gastrointestinales. WO2008/048986 también se basa en la medición de la expresión de genes seleccionados en una lista para clasificar individuos como respondedores o no respondedores a un tratamiento para enfermedades inflamatorias intestinales. Otro ejemplo es EP2056110 que describe la detección de proteínas específicas para evaluar la respuesta a un tratamiento anti-TNF.

35 La presente invención se refiere a la terapia con células Tr1 usada para tratar enfermedades inflamatorias crónicas, enfermedades autoinmunes, enfermedades alérgicas y condiciones de trasplante de órganos. Como se ha mostrado anteriormente, las células Tr1 se pueden usar para tratar la esclerosis múltiple (WO2009052283), afecciones inflamatorias intestinales tales como enfermedad de Crohn (WO2009068575) o afecciones artríticas tales como artritis reumatoide (WO2009054242). Cottrez et al., 2000, describen la capacidad de los clones de células T Tr1 específicos de OVA para inhibir las citocinas específicas de OVA y las respuestas de Ab.

40 Aunque se han descrito biomarcadores para evaluar el resultado de terapias contra esas condiciones, existe la necesidad de biomarcadores que permitan específicamente la predicción del resultado de una terapia con células Tr1. Existe una necesidad de estratificación de pacientes que están siendo sometidos a una terapia con células Tr1 y para distinguir entre pacientes que responden a la terapia con células Tr1 y pacientes que no responden.

Resumen

45 Un objeto de la invención es un método para evaluar si un paciente, preferiblemente un paciente humano, sometido a una terapia con células Tr1 específica de antígeno está respondiendo al tratamiento, comprendiendo dicho método:

- determinar in vitro la proliferación específica de antígeno de células T contenidas en una muestra de células de dicho paciente,

- comparar dicha proliferación específica de antígeno con una referencia estándar,

determinando así si el paciente está respondiendo o no al tratamiento.

En una realización de la invención, la referencia estándar es una referencia estándar obtenida del paciente, que es la proliferación específica de antígeno de células T contenidas en una muestra de células obtenida de dicho paciente antes del tratamiento con células Tr1.

5 En otra realización de la invención, la muestra de células que contiene células T se obtiene del paciente entre el día 8 y el día 30 después de la última administración de células Tr1 al paciente. En una realización, la determinación in vitro de la proliferación específica de antígeno de células T se lleva a cabo en una muestra de células obtenida del paciente entre el día 8 y el día 30 después de la última administración de células Tr1 al paciente.

10 En otra realización de la invención, la muestra de células es células mononucleares de sangre periférica, glóbulos blancos periféricos o se obtiene de una biopsia de los ganglios linfáticos, una biopsia intestinal, una biopsia sinovial, un líquido cefalorraquídeo o de un lavado broncoalveolar.

En otra realización de la invención, la evaluación de la proliferación específica de antígeno de células T comprende:

- cultivar la muestra de células que contiene células T en presencia del antígeno para el cual están dirigidas las células Tr1, y

15 - determinar la proliferación de células T después de 2 a 10 días de cultivo.

En otra realización de la invención, el método como se describe en este documento anteriormente se repite cada semana en una muestra de células obtenida del paciente cada semana durante el día 8 al día 30 después de la última administración de células Tr1 al paciente.

20 En otra realización de la invención, el método como se describe en este documento anteriormente se repite cada dos semanas en una muestra de células obtenida del paciente cada dos semanas durante el día 8 al día 30 después de la última administración de células Tr1 al paciente.

Otro objeto de la invención es el método como se describe en este documento anteriormente para clasificar al paciente en un grupo respondedor o no respondedor.

25 Otro objeto de la invención es el método como se describe en este documento anteriormente para monitorear la progresión de la enfermedad y monitorizar el resultado terapéutico.

Otro objeto de la invención es el método como se describe en este documento anteriormente para evaluar si un paciente que tiene enfermedad de Crohn y se somete a una terapia con células Tr1 específica de ovoalbúmina está respondiendo al tratamiento.

30 Otro objeto de la invención es el método como se describe en este documento anteriormente para evaluar si un paciente que tiene artritis reumatoide y se somete a una terapia con células Tr1 específica de colágeno tipo II está respondiendo al tratamiento.

35 Otro objeto es el método como se describe en este documento anteriormente para evaluar si un paciente sometido a una terapia con células Tr1 específica de antígeno responde al tratamiento. Ventajosamente, dicho método es para evaluar in vitro si un paciente sometido a una terapia con células Tr1 específica de antígeno está respondiendo al tratamiento.

Descripción detallada de la invención

40 La terapia con células Tr1 tal como se describió previamente por los inventores se basa en la administración de células Tr1 específicas de antígeno a un sujeto. En una realización de la invención, las células Tr1 específicas de antígeno no se estimulan con dicho antígeno antes de la administración. En una realización de la invención, la terapia con células Tr1 no comprende la administración del antígeno para el cual las células Tr1 son específicas. La selección del antígeno se realiza de acuerdo con la enfermedad o condición que se va a tratar. Por ejemplo, para tratar una condición inflamatoria intestinal tal como enfermedad de Crohn, se utilizan células Tr1 específicas para un antígeno alimentario de una dieta humana común tal como ovoalbúmina.

45 Los inventores evaluaron la proliferación de células T contenidas en una muestra de células obtenida del paciente tratado en respuesta al antígeno para el cual las células Tr1 son específicas. Hicieron la observación de que una inhibición de dicha proliferación se correlaciona con la mejora de la enfermedad y la respuesta clínica del paciente.

Un objeto de la invención es, por lo tanto, un método para evaluar si un paciente sometido a una terapia con células Tr1 específica de antígeno está respondiendo al tratamiento, comprendiendo dicho método:

- determinar in vitro la proliferación específica de antígeno de células T contenidas en una muestra de células de dicho paciente,

- comparar dicha proliferación específica de antígeno con una referencia estándar, determinando de este modo si el paciente está respondiendo o no al tratamiento.

5 En una realización, el paciente es un ser humano.

En una realización, el paciente no responde adecuadamente a, o es poco probable que responda adecuadamente a, uno o más agentes terapéuticos seleccionados en el grupo que comprende anti-TNF, natalizumab, anti-interleucinas tales como, por ejemplo, anti-IL1, anti-IL6, anti-IL12, anti-IL17 y anti-IL23; linfocitos anti-B; moléculas anti-coestimuladoras; agentes tolerogénicos; proteínas anti-complemento; inhibidores de moléculas de señalización de células T; inhibidores de la migración celular; análogos del antagonista del receptor de IL-1 (anakinra); 5 ácido aminosalicílico y análogos tales como mesalazina, sulfazalina, sulfasalazina, olsalazina, balsalazida; corticoides tales como prednisona, budesonida, hidrocortisona, prednisolona, metilprednisolona, betametasona, bedometasona, tixocortol; probióticos tales como *saccharomyces boulardii*; metotrexato; hidroxicloroquina; azatioprina; 6-mercaptopurina; ciclosporina; minociclina; D-penicilamina; talidomida; leflunomida o leflumida.

10

15

Como se utiliza en este documento, las expresiones "respuesta inadecuada", "no responde adecuadamente a" o "poco probable que responda adecuadamente" se refieren a una respuesta real o probable de un paciente que indica que la terapia ha sido o es probable para ser, ineficaz, tóxico o poco tolerado en lo que respecta al paciente.

20

El término "células Tr1" como se utiliza en este documento se refiere a células que tienen el siguiente fenotipo en reposo CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ y capaces de secretar niveles elevados de IL-10 y niveles significativos de TGF- β tras la activación. Las células Tr1 se caracterizan, en parte, por su perfil de citoquina único: producen altos niveles de IL-10, niveles significativos de TGF- β y niveles intermedios de IFN- γ , pero poca o ninguna IL-4 o IL-2. La producción de citoquinas se evalúa por lo general en cultivos de células después de la activación con activadores policlonales de linfocitos T tales como anticuerpos anti-CD3 + anti-CD28 o interleucina-2, PMA + ionomicina. Alternativamente, la producción de citoquinas se evalúa en cultivos de células después de la activación con el antígeno específico de células T presentado por las células presentadoras de antígeno. Los altos niveles de IL-10 corresponden a al menos aproximadamente 500 pg/mL, por lo general mayor que aproximadamente 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 o 20 mil pg/ml o más. Los niveles significativos de TGF- β corresponden a al menos aproximadamente 100 pg/mL, por lo general mayor que aproximadamente 200, 300, 400, 600, 800 o 1000 pg/mL o más. Los niveles intermedios de IFN- γ corresponden a concentraciones comprendidas entre 0 pg/mL y al menos 400 pg/mL, por lo general mayores de aproximadamente 600, 800, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800 o 2000 pg/mL o más. Poca o ninguna IL-4 o IL-2 corresponde a menos de aproximadamente 500 pg/mL, preferiblemente menos de aproximadamente 250, 100, 75 o 50 pg/mL, o menos.

30

El término "tratamiento" como se utiliza en este documento se refiere al tratamiento terapéutico y a medidas profilácticas y preventivas, en donde el objeto es prevenir o disminuir (reducir, disminuir) el trastorno o condición patológica objetivo. El tratamiento con Tr1 y la terapia con Tr1 se utilizan en este documento con el mismo significado.

35

El término "referencia estándar", como se utiliza en este documento, abarca ampliamente cualquier patrón de referencia apropiado que se pueda utilizar como base para la comparación con respecto a la variable medida. Preferiblemente, la referencia estándar es una referencia personalizada, determinada utilizando una muestra de células que contiene células T obtenidas del paciente antes del tratamiento con Tr1.

40

En una realización de la invención, la referencia estándar es la proliferación de las células T obtenidas del paciente antes del tratamiento con Tr1 y medidas in vitro. De acuerdo con lo anterior, se obtiene una muestra de células que contiene células T del paciente antes del tratamiento con Tr1; preferiblemente el día de la primera infusión de células Tr1 antes de la inyección de células Tr1, y se evalúa la proliferación de las células T para determinar la referencia estándar.

45

En una realización, la referencia estándar es un valor de índice o se deriva de uno o más algoritmos de predicción de riesgo o índices calculados para la respuesta a una terapia con células Tr1. Una referencia estándar puede ser relativa a un número o valor derivado de estudios de población, incluyendo, sin limitación, tales sujetos con un rango de edad similar, sujetos del mismo grupo étnico o similar, sujetos con antecedentes familiares de enfermedades inflamatorias crónicas, enfermedades autoinmunes o alérgicas; o con respecto a la muestra inicial de un sujeto sometido a terapia con células Tr1, para una enfermedad inflamatoria crónica, una enfermedad autoinmune o una enfermedad alérgica.

50

En una realización, la referencia estándar se construye utilizando algoritmos y otros métodos de clasificación estadística y estructural.

En una realización de la invención, la referencia estándar se deriva de la medición de la proliferación de células T en respuesta al antígeno para el cual las células Tr1 son específicas en una muestra de control derivada de uno o más sujetos que son sustancialmente sanos. Como se utiliza en este documento, un "sujeto sustancialmente sano" no ha

sido previamente diagnosticado o identificado como que tiene o que sufre de una enfermedad inflamatoria crónica, una enfermedad autoinmune o una enfermedad alérgica.

5 En otra realización de la invención, la referencia estándar se deriva de la medición de la proliferación de células T en respuesta al antígeno para el cual las células Tr1 son específicas en una muestra de control derivada de uno o más sujetos diagnosticados o identificados como que tienen o que sufren de una enfermedad inflamatoria crónica, una enfermedad autoinmune o una enfermedad alérgica.

10 En otra realización de la invención, la referencia estándar se deriva de la medición de la proliferación de células T en respuesta al antígeno para el cual las células Tr1 son específicas en una muestra derivada de uno o más sujetos que han sido previamente identificados como respondedor(es) a una terapia con células Tr1 para tratar una enfermedad inflamatoria crónica, una enfermedad autoinmune o una enfermedad alérgica.

15 En otra realización de la invención, la referencia estándar se deriva de la medición de la proliferación de células T en respuesta al antígeno para el cual las células Tr1 son específicas en una muestra derivada de uno o más sujetos que han sido previamente identificados como no-respondedor(es) a una terapia con células Tr1 para tratar una enfermedad inflamatoria crónica, una enfermedad autoinmune o una enfermedad alérgica.

De acuerdo con una realización de la invención, la muestra de células comprende células T y células presentadoras de antígeno.

20 Las muestras de células obtenibles del paciente y que contienen células T y células presentadoras de antígeno incluyen, pero no se limitan a, células mononucleares de sangre periférica (PBMC), glóbulos blancos periféricos, muestras de células obtenidas de biopsias de tejido tales como biopsias de ganglios linfáticos, biopsias intestinales o sinoviales, muestras de células obtenidas de lavado broncoalveolar o un líquido cefalorraquídeo.

Los métodos para obtener PBMC del paciente incluyen, pero no se limitan a, leucaféresis o recolección de sangre entera seguida por purificación de PBMC utilizando centrifugación de densidad con gradiente (ficoll).

Los métodos para obtener glóbulos blancos periféricos o leucocitos incluyen, pero no se limitan a, la filtración de glóbulos rojos o la lisis de la muestra de sangre.

25 Un ejemplo del método para evaluar si un paciente sometido a una terapia con células Tr1 específica de antígeno está respondiendo al tratamiento es el siguiente:

- cultivar la muestra de células que contiene las células T obtenidas del sujeto en presencia del antígeno para el cual están dirigidas las células Tr1,

- determinar la proliferación de células T.

30 En una realización de la invención, la muestra de células que contiene células T obtenidas del sujeto se cultiva en presencia del antígeno para el cual están dirigidas las células Tr1 y en ausencia de dicho antígeno.

El cultivo sin dicho antígeno es un control negativo de la proliferación de células T basales en ausencia de activación.

En una realización de la invención, la muestra de células que contiene células T se cultiva durante 2 a 10 días, preferiblemente durante 3 a 6 días, más preferiblemente durante 5 días.

35 En una realización de la invención, la concentración de células que se va a cultivar es de 10^4 a 10^7 células/ml, preferiblemente de 10^5 a 10^6 células/ml, más preferiblemente 10^6 células/ml.

40 En una realización de la invención, la concentración de antígeno es de 0.1 $\mu\text{g/ml}$ a 10 mg/ml de antígeno, preferiblemente de 1 $\mu\text{g/ml}$ a 1 mg/mL , más preferiblemente es de aproximadamente 1 mg/mL de antígeno. Como se utiliza en este documento, el término "aproximadamente" que precede a una figura significa más o menos 10% del valor de dicha figura.

En una realización de la invención, la muestra de células que contiene células T se cultiva en un medio de células T complementado con suero o en un medio libre de suero.

45 Ejemplos de medio libre de suero de células T incluyen, pero no se limitan a, X-VIVO y AIM-V. Ejemplos de suero de células T suplementado con suero incluyen, pero no se limitan a, medio RPMI o ISCOVE preferiblemente suplementado con suero humano AB o plasma autólogo.

En una realización de la invención, la muestra de células que contiene células T se cultiva a una temperatura de 35°C a 39°C , preferiblemente aproximadamente de 37°C , en una atmósfera de aproximadamente 5% de CO_2 .

De acuerdo con la invención, la proliferación de las células T contenidas en una muestra de células obtenida del paciente en respuesta al antígeno específico al que están dirigidas las células Tr1 se evalúa por métodos convencionales conocidos en la técnica.

5 Ejemplos de dichos métodos incluyen, pero no se limitan a, ensayo de timidina tritiada, cambio en la medición del contenido de ADN, ensayo de incorporación de BrdU, medición del marcador de viabilidad tal como WST1 o MTT, ensayo de proliferación celular no radioactiva Promega cell titer 96 AQueous o Kit de ensayo de proliferación de células de Promega CellTiter 96 Aqueous One solution y análisis de citometría de flujo utilizando CFSE o PKH26.

En una realización de la invención, la muestra de células que contiene células T se obtiene del paciente entre el día 8 y el día 30 después de la última administración de las células Tr1 específicas del antígeno al paciente.

10 En una realización de la invención, la muestra de células que contiene células T se obtiene del paciente entre el día 8 y el día 30, entre el día 9 y el día 30, entre el día 10 y el día 30, entre el día 11 y el día 30, entre el día 12 y el día 30, entre el día 13 y el día 30, entre el día 14 y el día 30, entre el día 15 y el día 30, entre el día 16 y el día 30, entre el día 17 y el día 30, entre el día 18 y el día 30, entre el día 19 y el día 30, entre el día 20 y el día 30 o entre el día 21 y el día 30 después de la administración de las células Tr1 específicas del antígeno al paciente.

15 En una realización, un método para evaluar si un paciente sometido a una terapia con células Tr1 específica de antígeno está respondiendo al tratamiento comprende las siguientes etapas:

- evaluar la proliferación de células T en una muestra de células obtenida del paciente antes del tratamiento con Tr1, preferiblemente el día de la primera infusión de células Tr1 antes de la inyección de células Tr1, siendo dicha proliferación la referencia estándar;

20 - llevar a cabo la terapia con células Tr1, que comprende una o más inyecciones de células Tr1;

- evaluar la proliferación de células T en una muestra de células obtenida del paciente 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 días después de la última inyección de células Tr1; y

- comparar dicha proliferación de células T determinada después de la inyección de células Tr1 a la referencia estándar.

25 En una realización, dicho valor o índice de proliferación de células T se calcula de la siguiente manera: (proliferación de células T en presencia del antígeno para el cual están dirigidas las células Tr1) / (proliferación de células T en ausencia del antígeno para el cual están dirigidas las células Tr1).

En una realización, un método para evaluar si un paciente sometido a una terapia con células Tr1 específica de antígeno está respondiendo al tratamiento comprende las siguientes etapas:

- llevar a cabo el tratamiento con células Tr1, que comprende una o más inyecciones de células Tr1;

30 - evaluar la proliferación de células T en una muestra de células obtenida del paciente 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 días después de la última inyección de células Tr1; y

- comparar dicha proliferación de células T con una referencia estándar.

35 En una realización de la invención, se obtiene una muestra de células que contiene células T del paciente antes del tratamiento con Tr1 y cada semana después de la última administración del tratamiento con Tr1, durante al menos 4 semanas. De acuerdo con lo anterior, el método de la invención se realiza cada semana.

En otra realización de la invención, se obtiene una muestra de células que contiene células T del paciente antes del tratamiento con Tr1 y cada dos semanas después de la última administración del tratamiento con Tr1, durante al menos 4 semanas. De acuerdo con lo anterior, el método de la invención se realiza cada dos semanas.

40 En otra realización de la invención, se obtiene una muestra de células que contiene células T del paciente antes del tratamiento con Tr1 y cada 10 días después de la última administración del tratamiento con Tr1, durante al menos 4 semanas. De acuerdo con lo anterior, el método de la invención se realiza cada 10 días.

En una realización de la invención, una muestra de células que contiene células T se obtiene del paciente antes de la administración de la célula Tr1 y cada semana después de la administración, durante al menos 8 semanas.

45 En una realización de la invención, se obtiene una muestra de células que contiene células T del paciente antes de la administración de la célula Tr1 y cada dos semanas después de la administración, durante al menos 8 semanas.

En una realización de la invención, una muestra de células que contiene células T se obtiene del paciente antes de la administración de la célula Tr1 y cada 4 semanas después de la administración, durante al menos 8 semanas.

En una realización de la invención, una muestra de células que contiene células T se obtiene del paciente antes de la administración de la célula Tr1 y cada mes después de la administración, durante al menos 2 meses.

En una realización de la invención, se obtiene una muestra de células que contiene células T del paciente antes de la administración de células Tr1 y en la semana 3 y/o en la semana 5 y/o en la semana 8 después de la administración.

5 De acuerdo con la invención, la disminución de la proliferación de células T en comparación con la referencia estándar indica que el sujeto está respondiendo al tratamiento.

En una realización de la invención, una disminución de la proliferación de células T en presencia de antígeno superior o igual al 20% en comparación con la referencia estándar indica que el sujeto está respondiendo al tratamiento.

10 En otra realización de la invención, una disminución de la proliferación de células T en presencia de antígeno superior o igual al 30%, 40%, 50% en comparación con la referencia estándar indica que el sujeto está respondiendo al tratamiento.

En otra realización de la invención, una disminución de la proliferación de células T en presencia de antígeno superior o igual al 60%, 70%, 80%, 90% en comparación con la referencia estándar indica que el sujeto está respondiendo al tratamiento.

15 En otra realización de la invención, se puede determinar un índice de proliferación (PI) en cada medición:

PI = Proliferación de células T en la presencia de antígeno/proliferación de células T en la ausencia de antígeno

Un PI determinado a un tiempo dado inferior a el PI de referencia estándar indica que el sujeto está respondiendo al tratamiento.

En otra realización de la invención, se puede determinar una proporción de proliferación (PR):

20
$$PR = (PI)_t / (PI)_{t0}.$$

(PI)_t representa el índice de proliferación determinado en un momento dado, por ejemplo, determinado a las 3 semanas u 8 semanas después de la administración de la célula Tr1 al paciente.

25 (PI)_{t0} representa el índice de proliferación determinado en t₀ que es el índice de proliferación de la referencia estándar o que es el índice de proliferación calculado a partir de la proliferación específica de antígeno de células T en una muestra de células obtenida del paciente antes de la inyección de células Tr1 a dicho paciente.

Una PR inferior a 1 indica que el sujeto está respondiendo al tratamiento.

Se describe un método para evaluar si un paciente sometido a una terapia con células Tr1 específica de antígeno está respondiendo al tratamiento, comprendiendo dicho método:

30 - determinar la proliferación específica de antígeno de células T contenidas en una muestra de células de dicho paciente in vitro,

- comparar dicha proliferación específica de antígeno con una referencia estándar,

clasificando de este modo el sujeto en el grupo respondedor o no respondedor.

El término "respondedor" como se utiliza en este documento se refiere a un paciente que responde o es probable que responda en un futuro próximo a la terapia o tratamiento.

35 El término "no respondedor", como se utiliza en este documento, se refiere a un paciente que no responde o es poco probable que responda en un futuro próximo a la terapia o tratamiento.

40 De acuerdo con lo anterior, la clasificación de un paciente como "respondedor" indica que el tratamiento con Tr1 es exitoso, mientras que un paciente identificado como "no respondedor" probablemente probaría diferentes terapias. La clasificación de los pacientes como respondedores o no respondedores es ventajosa ya que permite la predicción del curso óptimo de la terapia para el paciente.

En una realización, un paciente que tiene un PR inferior a 1 determinado 2 semanas, preferiblemente 3 semanas después de la administración de la célula Tr1, tiene una probabilidad superior al 50% de responder a esa terapia. Preferiblemente, en la presente invención, un paciente que tiene un PR inferior a 1 determinado 2 semanas,

preferiblemente 3 semanas después de la administración de la célula Tr1, tiene una probabilidad superior al 60%, 70%, 80%, 90% o 95% o más de responder a la terapia con células Tr1.

En una realización, un paciente que tiene un PR inferior a 1 determinado de 3 semanas a 8 semanas después de la administración de la célula Tr1, tiene una probabilidad superior al 50% de responder a esa terapia.

- 5 Preferiblemente, en la presente invención, un paciente que tiene un PR inferior a 1 determinado de 3 semanas a 8 semanas después de la administración de la célula Tr1, tiene una probabilidad superior al 60%, 70%, 80%, 90% o 95% o más de responder a la terapia con células Tr1.

De acuerdo con la invención, el ensayo de la proliferación de células T obtenidas del paciente como se describe anteriormente permite el control de la enfermedad y la monitorización del resultado terapéutico.

- 10 De acuerdo con la invención, el ensayo de la proliferación de células T obtenidas del paciente como se describe anteriormente permite evaluar el riesgo del paciente de no responder al tratamiento y que su estado no mejora.

De acuerdo con la invención, el ensayo de la proliferación de células T obtenidas del paciente como se describe anteriormente permite la estratificación o clasificación de un grupo de pacientes.

- 15 De acuerdo con la invención, el método descrito anteriormente es para evaluar si un paciente que tiene una condición inflamatoria intestinal y se somete a una terapia con células Tr1 está respondiendo al tratamiento. En dicho tratamiento, el paciente es sometido a una terapia con células Tr1, en donde las células Tr1 son específicas de un antígeno alimentario de la dieta humana común.

- 20 El término "antígeno alimentario de una dieta humana común" se refiere a un péptido inmunogénico, que proviene de alimentos comunes para humanos, tales como antígenos alimentarios de la siguiente lista no limitativa: antígenos bovinos tales como lipocalina, S100 de unión a Ca, alfa-lactalbúmina, lactoglobulinas tales como beta-lactoglobulina, albúmina de suero bovino, caseínas. Los antígenos alimentarios también pueden ser antígenos del salmón atlántico tales como parvalbúmina, antígenos de pollo tales como ovomucoide, ovoalbúmina, Ag22, conalbúmina, lisozima o albúmina de suero de pollo, cacahuetes, antígenos de camarón tales como tropomiosina, antígenos de trigo tales como aglutinina o gliadina, antígenos de apio tales como profilina de apio, antígenos de zanahoria tales como profilina de zanahoria, antígenos de manzana tales como taumatina, proteína de transferencia de lípidos de manzana, profilina de manzana, antígenos de pera tales como profilina de pera, isoflavona reductasa, antígenos de aguacate tales como endoquitinasa, antígenos de albaricoque tales como proteína de transferencia lípido de albaricoque, antígenos de melocotón tales como proteína de transferencia de lípidos de melocotón o profilina de melocotón, antígenos de soja tales como HPS, profilina de soja o (SAM22) PR-10 prot, fragmentos, variantes y mezclas de los mismos.

- 30 Como se utiliza en este documento, el término "fragmento" de un antígeno se refiere a cualquier subconjunto de un antígeno, como un péptido más corto. En una realización, un fragmento de un antígeno es un péptido de al menos 6 aminoácidos de longitud. En una realización, un fragmento de un antígeno es un péptido de 6 a 50 aminoácidos de longitud, preferiblemente de 6 a 30 aminoácidos, más preferiblemente de 6 a 20 aminoácidos de longitud.

- 35 El término "variante" de un antígeno, tal como, por ejemplo, un antígeno alimentario de una dieta humana común, se refiere en este documento a un antígeno que es casi idéntico al antígeno natural y que comparte la misma actividad biológica. La diferencia mínima entre el antígeno natural y sus variantes puede estar, por ejemplo, en una sustitución, delección y/o adición de aminoácidos. Dichas variantes pueden contener, por ejemplo, sustituciones de aminoácidos conservativas en las que los residuos de aminoácidos se sustituyen por residuos de aminoácidos que tienen una cadena lateral similar. Se han definido en la técnica familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares, incluyendo cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, Glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina).

- 45 En una realización, la variante de un antígeno presenta una identidad de secuencia de al menos o aproximadamente 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% con la secuencia del antígeno natural. El término "identidad" o "idéntico", cuando se usa en una relación entre las secuencias de dos o más polipéptidos, se refiere al grado de relación de secuencias entre polipéptidos, según se determina por el número de coincidencias entre cadenas de dos o más residuos de aminoácidos. "Identidad" mide el porcentaje de coincidencias idénticas entre las secuencias más pequeñas de dos o más con alineaciones de brecha (si las hay) dirigidas por un modelo matemático particular o programa informático (es decir, "algoritmos"). La identidad de los polipéptidos relacionados se puede calcular fácilmente por métodos conocidos. Tales métodos incluyen, pero no se limitan a, los descritos en Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York, 1991; y Carillo et

- al., SIAM J. Applied Math. 48, 1073 (1988). Los métodos preferidos para determinar la identidad están diseñados para dar la coincidencia más grande entre las secuencias ensayadas. Los métodos para determinar la identidad se describen en programas informáticos disponibles públicamente. Los métodos de programa de ordenador preferidos para determinar la identidad entre dos secuencias incluyen el paquete de programas de GCG, incluyendo GAP (Devereux et al., Nucl. Acid. Res. \2, 387 (1984); Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, Wis.), BLASTP, BLASTN, y FASTA (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215, 403-410 (1990)). El programa BLASTX está disponible públicamente en el National Center for Biotechnology Information (NCBI) y en otras fuentes (BLAST Manual, Altschul et al. NCB/NLM/NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul et al., supra). El conocido algoritmo de Smith Waterman también se puede usar para determinar la identidad.
- 5
- 10 El término "condición intestinal inflamatoria" se refiere a enfermedad inflamatoria intestinal, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, inflamación intestinal ligada a alergia alimentaria o intolerancia, inflamación intestinal ligada a alergia a proteínas de la leche, inflamación intestinal ligada a enfermedad celíaca, inflamación intestinal ligada a la alergia al huevo de gallina o la inflamación intestinal relacionada con la alergia al cacahuete.
- 15 De acuerdo con la invención, la muestra de células que contiene células T obtenidas del paciente se cultiva en presencia del antígeno alimentario de una dieta humana común a la que se dirigen las células Tr1 infundidas en el paciente. Después de 2 a 10 días, se evalúa la proliferación de las células T y se compara con la proliferación de la referencia estándar, por ejemplo, la proliferación de células T obtenidas del paciente antes del tratamiento con Tr1.
- En una realización de la invención, el método de la invención es para evaluar si un paciente que tiene enfermedad de Crohn y se somete a una terapia con células Tr1 específica de ovalbúmina está respondiendo al tratamiento.
- 20 De acuerdo con la invención, el método descrito anteriormente es para evaluar si un paciente que tiene una condición de esclerosis múltiple y se somete a una terapia con células Tr1 está respondiendo al tratamiento. En dicho tratamiento, el paciente es sometido a una terapia con células Tr1, en donde las células Tr1 son específicas de un antígeno asociado a esclerosis múltiple.
- 25 La expresión "antígeno asociado a esclerosis múltiple" se refiere a proteína básica de mielina (MBP), glucoproteína asociada a mielina (MAG), proteína oligodendrocitaria de mielina (MOG), proteína proteolipídica (PLP), oligoproteína de mielina oligodendrocita (OMGP), proteína básica de oligodendrocito asociada a mielina (OSP/Claudin1 1), proteínas de choque térmico, proteínas específicas de oligodendrocitos (OSP), NOGO A, glicoproteína Po, proteína de mielina periférica 22 (PMP22), nucleótido 3'-fosfodiesterasa 2'-3'-cíclica (CNPasa), fragmentos, variantes y mezclas de los mismos.
- 30 De acuerdo con la invención, la muestra de células que contiene células T obtenidas del paciente se cultiva en presencia del antígeno asociado a esclerosis múltiple al que están dirigidas las células Tr1 infundidas en el paciente. Después de 2 a 10 días, se evalúa la proliferación de las células T y se compara con la proliferación de la referencia estándar, por ejemplo, la proliferación de células T obtenidas del paciente antes del tratamiento con Tr1.
- 35 En una realización de la invención, el método de la invención es para evaluar si un paciente que tiene una enfermedad de esclerosis múltiple y se somete a terapia con células Tr1 específica de MBP o MOG está respondiendo al tratamiento.
- De acuerdo con la invención, el método descrito anteriormente es para evaluar si un paciente que tiene una condición artrítica y se somete a una terapia con células Tr1 está respondiendo al tratamiento. En dicho tratamiento, el paciente es sometido a una terapia con células Tr1, en donde las células Tr1 son específicas de un antígeno asociado a una articulación.
- 40 El término "antígeno asociado a una articulación" se refiere a péptidos de filagrina cíclicos y lineales sustituidos con citrulina, péptidos de colágeno tipo II, péptidos de glicoproteína 39 de cartílago humano (HCgp39), HSP, péptidos A2 de ribonucleoproteína nuclear heterogénea (hnRNP), hnRNP BI, hnRNP D, Ro60/52, HSP60, 65, 70 y 90, BiP, queratina, vimentina, fibrinógeno, péptidos de colágeno tipo I, III, IV y V, anexina V, Glucosa 6 fosfato isomerasa (GPI), acetilcalpastatina, piruvato deshidrogenasa (PDH), aldolasa, topoisomerasa I, snRNP, PARP, Scl-70, Scl-100, antígeno de fosfolípido incluyendo cardiolipina aniónica y fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina de carga neutra y fosfatidilcolina, metaloproteinasa de matriz, fibrilina, aggrécano, fragmentos, variantes y mezclas de los mismos.
- 45 El término "condición artrítica" se refiere a artritis reumatoide, policondritis, artritis séptica, espondiloartropatías o espondilitis anquilosante, artritis idiopática juvenil (JIA), artritis psoriásica y enfermedades asociadas con artritis tales como lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjogren, escleroderma, dermatomiositis, poliomyelitis, polimialgia reumática, fibromialgia, sarcoidosis o vasculitis.
- 50 De acuerdo con la invención, la muestra de células que contiene células T obtenidas del paciente se cultiva en presencia del antígeno asociado a la articulación al que están dirigidas las células Tr1 infundidas en el paciente. Después de 2 a 10 días, se evalúa la proliferación de las células T y se compara con la proliferación de la referencia estándar, por ejemplo, la proliferación de células T obtenidas del paciente antes del tratamiento con Tr1.
- 55

En una realización de la invención, el método de la invención es para evaluar si un paciente que tiene artritis reumatoide y se somete a una terapia con células Tr1 específica de colágeno de tipo II está respondiendo al tratamiento.

5 De acuerdo con la invención, el método descrito anteriormente es para evaluar si un paciente que tiene una condición inflamatoria autoinmune y se somete a una terapia con células Tr1 está respondiendo al tratamiento. En dicho tratamiento, el paciente es sometido a una terapia con células Tr1, en donde las células Tr1 son específicas de un antígeno HSP humano.

El término "antígeno HSP humano" se refiere a HSP60, HSP70, HSP90, fragmentos, variantes y mezclas de los mismos.

10 El término "condición inflamatoria autoinmune" se refiere a estados inflamatorios intestinales tales como enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa; condición de artritis, tales como artritis reumatoide, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante y artritis idiopática juvenil; esclerosis múltiple; enfermedad de Wegener; cirrosis biliar primaria; colangitis esclerosante primaria; asma, rechazo de trasplante (enfermedad de huésped contra injerto); o enfermedad de injerto contra huésped. Más preferiblemente, dicha enfermedad autoinmune inflamatoria se selecciona en el grupo de artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, esclerosis múltiple, colitis ulcerosa, asma y rechazo de trasplante o enfermedad de injerto contra huésped.

15 De acuerdo con la invención, la muestra de células que contiene células T obtenidas del paciente se cultiva en presencia del antígeno HSP humano al que están dirigidas las células Tr1 infundidas en el paciente. Después de 2 a 10 días, se evalúa la proliferación de las células T y se compara con la proliferación de la referencia estándar, por ejemplo, la proliferación de células T obtenidas del paciente antes del tratamiento con Tr1.

20 En una realización de la invención, el método de la invención es para evaluar si un paciente que tiene artritis reumatoide y se somete a una terapia con células Tr1 específica de HSP está respondiendo al tratamiento.

25 De acuerdo con la invención, el método descrito anteriormente es para evaluar si un paciente que tiene una condición alérgica o asmática y se somete a una terapia con células Tr1 está respondiendo al tratamiento. En dicho tratamiento, el paciente se somete a una terapia con células Tr1, en donde las células Tr1 son específicas de un alérgeno asociado a dicha condición alérgica o asmática.

Dicho alérgeno puede ser un alérgeno inhalado, un alérgeno ingerido o un alérgeno de contacto. El término "condición alérgica o asmática" se refiere al asma, dermatitis atópica, rinitis alérgica, conjuntivitis, eczema y anafilaxia.

30 De acuerdo con la invención, la muestra de células que contiene células T obtenidas del paciente se cultiva en presencia del alérgeno al que están dirigidas las células Tr1 infundidas en el paciente. Después de 2 a 10 días, se evalúa la proliferación de las células T y se compara con la proliferación de la referencia estándar, por ejemplo, la proliferación de células T obtenidas del paciente antes del tratamiento con Tr1.

Breve descripción de las figuras

35 Figura 1: (A) Cinética de la proliferación específica de ovoalbúmina de PBMC después del tratamiento con células Tr1 específicas de ovoalbúmina en pacientes con respuesta clínica (círculos negros, n=9) y pacientes sin respuesta clínica de la enfermedad de Crohn (cuadrados blancos, n=9). Los resultados se expresan como un índice medio de proliferación. (B) Cinética de proliferación específica de ovoalbúmina de PBMC después del tratamiento con células Tr1 específicas de ovoalbúmina en pacientes con respuesta clínica (círculos negros, n=10) y pacientes sin respuesta clínica de la enfermedad de Crohn (cuadrados blancos, n=10). Los resultados se expresan como una proporción media de proliferación.

40 Figura 2: (A) Cinética de proliferación específica de ovoalbúmina de PBMC en pacientes con respuesta clínica (CR) y pacientes con enfermedad de Crohn sin respuesta clínica antes del tratamiento con células Tr1 específicas de ovoalbúmina (barras negras) o de 3 semanas (barras blancas) específico Tr1. Los resultados se expresan como un índice de proliferación. (B) Cinética de proliferación específica de ovoalbúmina de PBMC en pacientes con respuesta clínica (CR) (n=10) y pacientes sin respuesta clínica con enfermedad de Crohn (CNR) (n=10) 3 semanas y 8 semanas después del tratamiento con células Tr1 específicas de ovoalbúmina. Los resultados se expresan como una proporción de proliferación.

50 Figura 3: (A) Porcentaje de pacientes con respuesta clínica (CR) y pacientes sin respuesta clínica con enfermedad de Crohn (CNR) que muestran la abrogación de la proliferación específica de ovoalbúmina in vitro 3 semanas después del tratamiento con células Tr1 específicas de ovoalbúmina. (B) Porcentaje de pacientes con respuesta clínica (CR) (n=10) y de pacientes sin respuesta clínica con enfermedad de Crohn (CNR) (n=10) que muestran una disminución de la proliferación específica de ovoalbúmina in vitro 3 semanas y 8 semanas después del tratamiento con células Tr1 específicas de ovoalbúmina.

Figura 4: Gráfico de proliferación específica de ovoalbúmina de PBMC de pacientes respondedores (Panel A) y pacientes no respondedores (Panel B) en función del CDAI más bajo tomado determinado entre 5 y 8 semanas después del tratamiento con células Tr1 específicas de ovalbúmina. Se observó una correlación logarítmica entre la proliferación específica de ovoalbúmina de PBMC de pacientes respondedores.

5 Figura 5: Evolución del número de células T CD4+ Foxp3+ en la sangre de los sujetos respondedores (círculos negros) y pacientes de la enfermedad de Crohn no respondedores (círculos blancos) medidos por citometría de flujo. Los resultados se expresan como el número de CD4+ Foxp3+ (recuentos absolutos) (mm³). Las barras de error son s.e.m.

Ejemplos

Procedimientos experimentales

10 Producción de clones Tr1 específicos de ovalbúmina

Se produjeron clones Tr1 específicos de ovoalbúmina a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de pacientes con enfermedad de Crohn. Después del aislamiento de PBMC por centrifugación de densidad con gradiente de Ficoll (GE Healthcare, Uppsala, Suecia), las células se cultivaron en presencia de ovoalbúmina irradiada nativa (Sigma Aldrich, St-Louis, MO, EE.UU.) en X-Vivo15 (Cambrex, East Rutherford, NJ) y sobrenadantes de células alimentadoras *Drosophila* enriquecidas con citoquinas a 37°C, CO₂ al 5%. Después de varios días de cultivo, las células se clonan mediante el método de dilución limitante en capas de células alimentadoras de *Drosophila* en X-Vivo15 a 37°C, CO₂ al 5%. Los clones en crecimiento se recolectan después y se ensayan para la especificidad del antígeno y la identidad de la célula Tr1 antes de expandirse sobre células alimentadoras de *Drosophila* hasta 5 billones.

15

Células alimentadoras de *Drosophila*

20 Las células alimentadoras de *Drosophila* fueron manipuladas por TxCell con el fin de mejorar la estimulación y el crecimiento de clones de células Tr1. Se transfectaron células de *Drosophila* de Schneider 2 con una forma transmembrana de un anticuerpo murino anti-CD3 humano, con CD80 humana, CD58 humana, IL-2 humana e IL-4 humana. Las células se cultivan rutinariamente en medio Express cinco de los laboratorios PAA (Pashing, Austria).

Tratamiento con células Tr1 de pacientes con enfermedad de Crohn

25 Un ensayo clínico de fase I / IIa para evaluar la tolerabilidad del tratamiento con Tr1 se inició en marzo de 2008 en pacientes con enfermedad de Crohn refractaria severa. 10⁶ a 10⁹ células Tr1 autólogas específicas de ovoalbúmina se infundieron por vía intravenosa a los pacientes en un momento en que el CDAI (índice de actividad de la enfermedad de Crohn, véase más adelante para la descripción) está por encima de 220 que confirma una enfermedad activa. Los pacientes fueron monitorizados durante 12 semanas para la actividad de la enfermedad

30 Evaluación de la respuesta clínica

El índice de actividad de la enfermedad de Crohn o CDAI es una herramienta de investigación utilizada para cuantificar la actividad de la enfermedad de pacientes con enfermedad de Crohn. Esto es de importancia en los estudios de investigación realizados sobre los medicamentos utilizados para tratar la enfermedad de Crohn; la mayoría de los estudios más importantes sobre nuevos medicamentos utilizan el CDAI para definir la respuesta o remisión de la enfermedad. Un puntaje de más de 220 identifica a un paciente con patología activa; un CDAI inferior o igual a 150 identifica un paciente en remisión de la enfermedad. Se considera que una disminución de 100 puntos de CDAI después del tratamiento con respecto al valor basal (CDAI tomado antes del tratamiento) es una respuesta al tratamiento (Directrices sobre el desarrollo de nuevos medicamentos para el tratamiento de la enfermedad de Crohn CPMP/EWP/2284/99).

35

40 Así, basándose en CDAI, los pacientes sometidos a tratamiento con células Tr1 autólogas específicas de ovoalbúmina se pueden clasificar en dos grupos: los pacientes con respuesta clínica (pacientes que presentaron una disminución de al menos 100 puntos de CDAI después del tratamiento en comparación con antes del tratamiento) y los pacientes sin respuesta clínica (pacientes que no muestran esta disminución de 100 puntos de CDAI en comparación con antes del tratamiento). El CDAI se calcula en la semana 0 (la semana antes de la infusión) y 1, 3, 5, 8 y/o 12 semanas después de la infusión de células Tr1.

45

Calculador de CDAI

Variable clínica o de laboratorio	Factor de ponderación
Número de deposiciones líquidas o blandas cada día durante siete días	X2
Dolor abdominal (grado de 0-3 en severidad) cada día durante siete días	X5

Bienestar general, evaluado subjetivamente de 0 (bien) a 4 (terrible) cada día durante siete días	X7
Presencia de complicaciones *	X20
Tomar Lomitol u opiáceos para la diarrea	X30
Presencia de una masa abdominal (0 como ninguna, 2 como cuestionable, 5 como definida)	X10
Desviación absoluta del hematocrito del 47% en los hombres y del 42% en las mujeres	X6
Porcentaje de desviación respecto al peso estándar	X1
* Complicaciones: artralgia, uveítis, eritema nodoso, úlceras aftosas, pioderma gangrenoso, fisura anal, fistula nueva, absceso (puntuación 1 por ítem).	

Evaluación de proliferación y cultivo celular

5 A la semana 0 (la semana antes de la infusión) y a las 1, 3, 8 y 12 semanas después de la infusión de células Tr1, se recogió la sangre periférica del paciente y se aislaron las PBMC mediante centrifugación de densidad con gradiente de Ficoll. Las células se cultivaron entonces a 10^6 células/ml en presencia o ausencia de ovoalbúmina (400 ng/ml) en medio XVivo15 durante 5 días a 37°C, CO₂ al 5%. Después de estos cinco días de cultivo, se midió la proliferación de las células incubadas utilizando el kit WST1 de Roche que permite evaluar el número de células viables por cultivo.

Citometría de flujo

10 La citometría de flujo se realizó en PBMC obtenida de pacientes con enfermedad de Crohn antes y después del tratamiento con células Tr1 específicas de ovoalbúmina. Las células se tiñeron con anticuerpo monoclonal anti-CD4 fluorescente PerCP-Cy5.5 (clon DK3 de Becton Dickinson Biosciences) y anticuerpo anti-FoxP3 marcado con APC fluorescente (clon PCH101 de eBioscience). Antes de la tinción con FoxP3, las células fueron permeabilizadas utilizando solución regulada de permeabilización eBioscience durante 30 minutos.

Resultados

15 El ensayo clínico descrito en este documento tiene como objetivo determinar la seguridad y la eficacia de una sola administración intravenosa de células Tr1 autólogas específicas de ovoalbúmina en pacientes con enfermedad activa de Crohn (CDAI por encima de 220). Después de la inclusión y el seguimiento de 18 pacientes durante 12 semanas después de la infusión celular, dos grupos de pacientes se pueden clasificar en función de su respuesta al tratamiento demostrada por la variación del CDAI comparada antes y después de la inyección celular (Véase Tabla 1).

20

Tabla 1

Número de paciente	CDAI antes del tratamiento	CDAI más bajo durante el seguimiento	Disminución de CDAI	Grupo respondedor R = con respuesta clínica NR = sin respuesta clínica
02	305	98	207	R
03	346	52	294	R
04	304	168	136	R
05	384	218	166	R
07	431	211	220	R
08	435	283	152	R
09	530	449	81	NR
12	277	224	53	NR

ES 2 609 437 T3

14	363	247	116	R
15	481	416	65	NR
16	335	230	105	R
17	347	254	93	NR
19	377	178	199	R
24	212	309	97	NR
25	396	312	84	NR
26	360	272	88	NR
33	292	205	87	NR
90	485	274	211	R

5 Se incluyeron 2 pacientes adicionales y se actualizaron los datos de CDAI al final del ensayo clínico después de un control por parte de asociados de investigación clínica de acuerdo con el procedimiento convencional. Los resultados se presentan en la Tabla 2. De acuerdo con las directrices sobre el desarrollo de nuevos medicamentos para el tratamiento de la enfermedad de Crohn CPMP/EWP/2284/99, se tomó en cuenta el CDAI más bajo determinado entre la semana 4 y la semana 8 después de la administración de células Tr1.

Tabla 2

Número de paciente	CDAI antes del tratamiento	CDAI más bajo en la semana 5 o la semana 8 después del tratamiento	Disminución de CDAI	Grupo respondedor R = con respuesta clínica NR = sin respuesta clínica
02	303	98	205	R
03	347	51	296	R
04	304	167	137	R
05	383	261	122	R
07	430	220	210	R
08	439	289	150	R
09	528	535	0	NR
12	277	307	0	NR
14	364	249	115	R
15	478	480	0	NR
16	333	258	75	NR
17	349	319	0	NR
19	375	178	197	R
24	212	190	22	NR

25	394	319	75	NR
26	362	367	0	NR
33	292	299	0	NR
90	502	366	136	R
35	293	247	46	NR
36	308	124	184	R

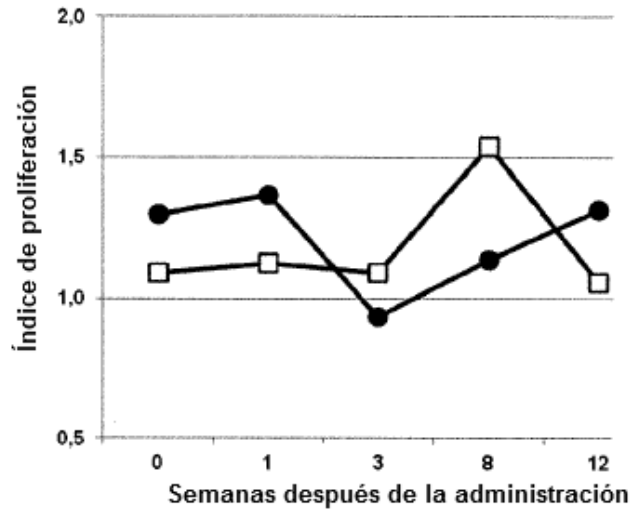
Los resultados demuestran que después de la infusión de células Tr1 autólogas específicas de ovoalbúmina, 10 pacientes muestran una respuesta al tratamiento, observándose dicha respuesta por una disminución del CDAI de al menos 100 puntos después del tratamiento en comparación con antes del tratamiento.

- 5 A continuación, se comparó la proliferación de PBMC específica de ovoalbúmina entre grupos respondedores y no respondedores de pacientes. Para este propósito, las PBMC aisladas de muestras de sangre recogidas antes o después del tratamiento se cultivaron en presencia o ausencia de ovoalbúmina y se evaluó la proliferación de las PBMC después de 5 días de cultivo.
- 10 La figura 1A muestra el índice de proliferación de los dos grupos durante todo el periodo de seguimiento. La figura 1B muestra la proporción de proliferación de los dos grupos durante todo el periodo de seguimiento. Estos datos muestran que después del tratamiento, la respuesta proliferativa a la ovoalbúmina disminuye sólo en pacientes que responden clínicamente y no en pacientes sin respuesta clínica.
- 15 La figura 2A muestra que específicamente a la semana 3 después de la infusión de células Tr1, la respuesta proliferativa disminuye en pacientes respondedores en comparación con la respuesta proliferativa antes de la infusión de células Tr1. Esto sugiere que después de la infusión intravenosa de células Tr1 específicas de ovoalbúmina, una acción inhibitoria sobre la respuesta de células T a la ovoalbúmina se produce in vivo en los pacientes, que está mediada por las células inyectadas. Esta respuesta biológica se observa en la mayoría (60%) de los pacientes que responden clínicamente, pero en un solo paciente del grupo sin respuesta clínica (13%) (Figura 3A).
- 20 La figura 2B muestra la proporción proliferativa para cada respondedor y no respondedor en la semana 3 y la semana 8 después del tratamiento con células Tr1. La media de las proporciones proliferativas en los pacientes respondedores es claramente inferior a 1 a las semanas 3 y 8 después del tratamiento con células Tr1, mientras que la media de las proporciones proliferativas en los pacientes no respondedores es claramente superior a 1 en la semana 3 y 8 después del tratamiento con células Tr1.
- 25 La figura 3B muestra que se observa una proporción de proliferación inferior a 1 en la semana 3 y la semana 8 en el 80% de los respondedores.
- La figura 4 muestra que una proporción de proliferación inferior a 1 está correlacionada estadísticamente con una disminución del CDAI en la semana 5 y la semana 8 después del tratamiento con células Tr1 en pacientes respondedores.
- 30 La figura 5 muestra que el número de células T reguladoras activadas (células CD4+ Foxp3+) en la sangre de pacientes que responden o no responden es similar. Además, el número de células T reguladoras activadas en la sangre de los pacientes que responden o no respondedores no fluctúa después de la terapia con células Tr1. De hecho, no hay diferencia entre el número de células T reguladoras en la sangre de los pacientes en la semana 0, en la semana 3 y en la semana 12 después de la infusión de células Tr1. Este resultado demuestra que la disminución de la respuesta proliferativa a la ovoalbúmina en pacientes respondedores no se debe a un aumento en el número total de células T reguladoras en la sangre de estos pacientes.
- 35

Reivindicaciones

1. Un método para evaluar si un paciente humano sometido a una terapia con células Tr1 específica de antígeno tiene una probabilidad superior al 50% de responder al tratamiento, comprendiendo dicho método:
- 5 - determinar in vitro la proliferación específica de antígeno de células T contenidas en una muestra de células obtenida de dicho paciente entre el día 8 y el día 30 después de la última administración de la terapia con células Tr1 específica de antígeno, en donde dicha proliferación específica de antígeno es específica del antígeno para el cual están dirigidas las células Tr1,
- 10 - comparar dicha proliferación específica de antígeno de células T con una referencia estándar en donde la referencia estándar es la proliferación específica de antígeno de células T contenida en una muestra obtenida de dicho paciente antes de la terapia con células Tr1 específica de antígeno, en donde dicha proliferación específica de antígeno se mide in vitro y es específico para el antígeno para el cual están dirigidas las células Tr1,
- determinando de este modo si el paciente tiene una probabilidad superior al 50% de responder a dicha terapia con células Tr1 específica del antígeno.
- 15 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la muestra de células es células mononucleares de sangre periférica, glóbulos blancos periféricos o se obtiene de una biopsia de los ganglios linfáticos, una biopsia intestinal, una biopsia sinovial, un líquido cefalorraquídeo o de un lavado broncoalveolar.
3. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde la determinación de la proliferación específica de antígeno de células T comprende:
- 20 - cultivar la muestra de células que contiene células T en presencia del antígeno para el cual están dirigidas las células Tr1, y
- determinar la proliferación de células T después de 2 a 10 días de cultivo.
4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la determinación del método se repite cada semana sobre una muestra de células obtenida del paciente cada semana durante el día 8 al día 30.
- 25 5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la determinación del método se repite cada dos semanas sobre una muestra de células obtenida del paciente cada dos semanas durante el día 8 al día 30.
6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para clasificar al paciente en un grupo respondedor o no respondedor.
- 30 7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para evaluar la enfermedad y monitorizar el resultado terapéutico.
8. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para evaluar si un paciente que tiene enfermedad de Crohn y se somete a una terapia con células Tr1 específica de ovoalbúmina tiene una probabilidad superior al 50% de responder al tratamiento.
- 35 9. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para evaluar si un paciente que tiene artritis reumatoide y se somete a una terapia con células Tr1 específica de colágeno de tipo II tiene una probabilidad superior al 50% de responder al tratamiento.
10. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende, además:
- 40 - determinar in vitro la proliferación específica de antígeno de células T contenidas en una muestra de células obtenida de dicho paciente entre la semana 4 y la semana 8 después de la última administración de la terapia con células Tr1 específica de antígeno, en donde dicha proliferación específica de antígeno es específica del antígeno para el cual están dirigidas las células Tr1,
- 45 - comparar dicha proliferación específica de antígeno de células T con una referencia estándar, en donde la referencia estándar es la proliferación específica de antígeno de células T contenida en una muestra obtenida de dicho paciente antes de la terapia con células Tr1 específicas del antígeno, en donde se mide dicha proliferación específica de antígeno in vitro y es específico para el antígeno para el cual están dirigidas las células Tr1,
- determinando así si el paciente tiene una probabilidad superior al 50% de responder a dicha terapia con células Tr1 específica del antígeno.

A



B

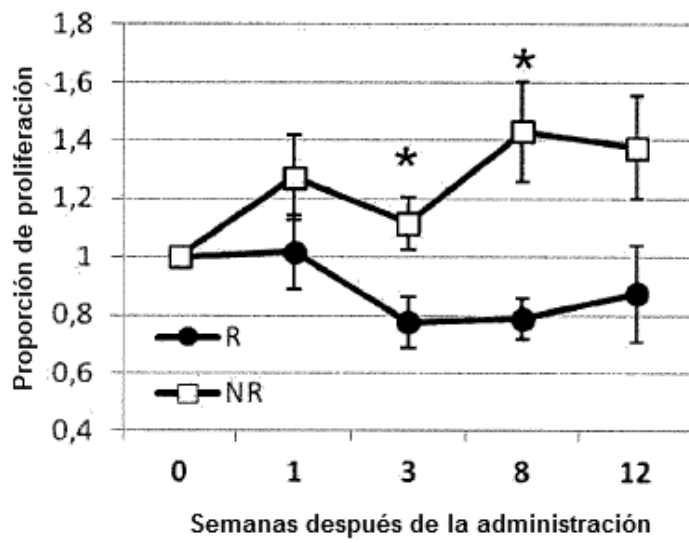
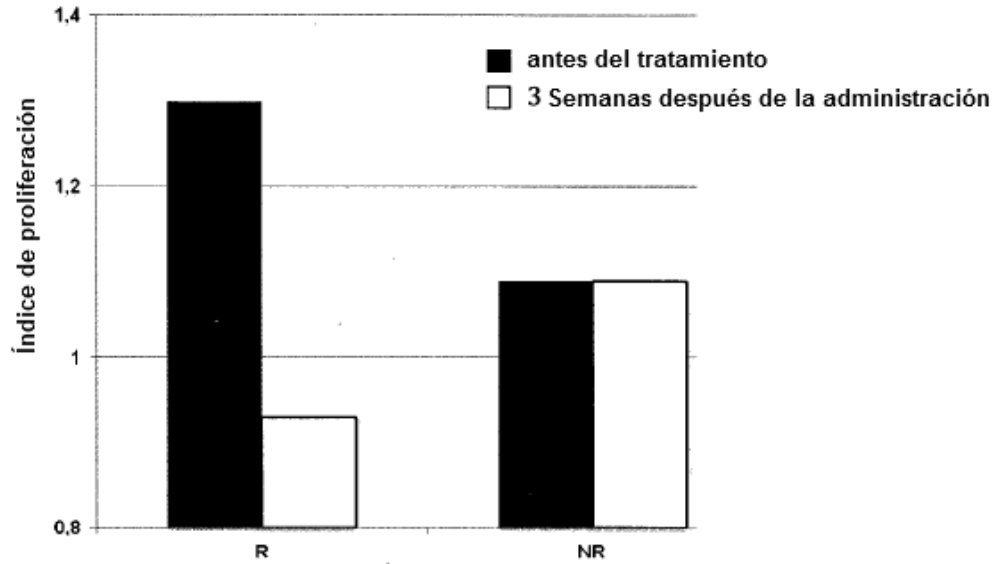


Figura 1

A



B

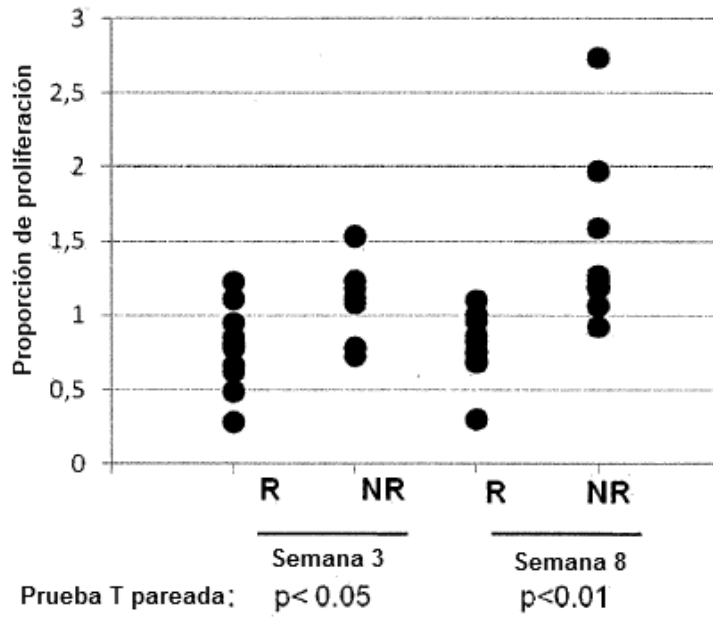
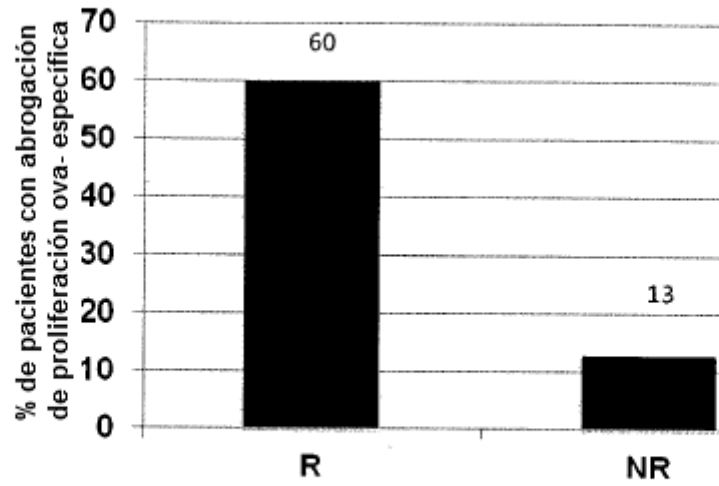


Figura 2

A



B

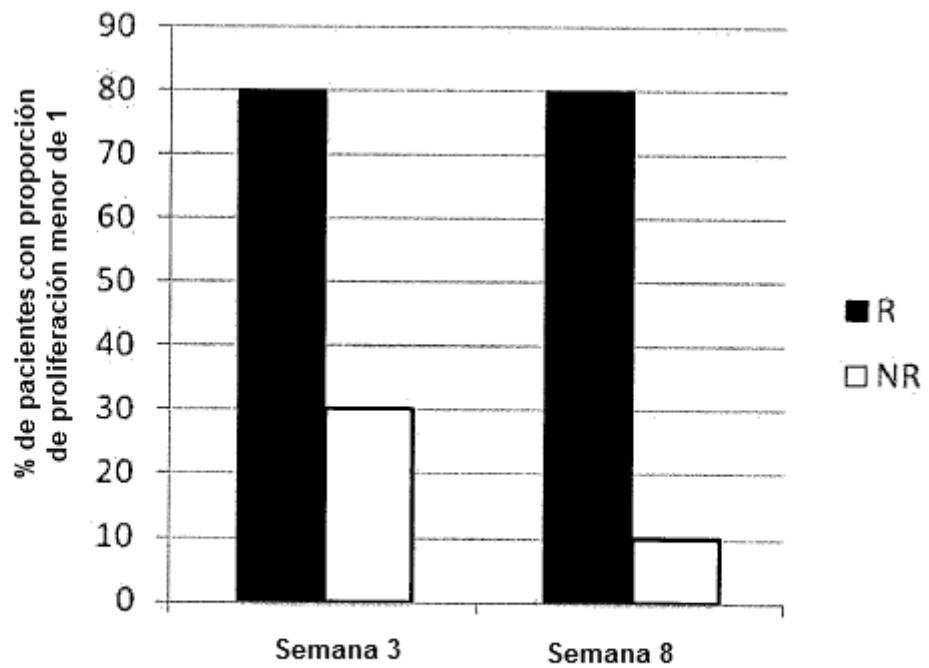
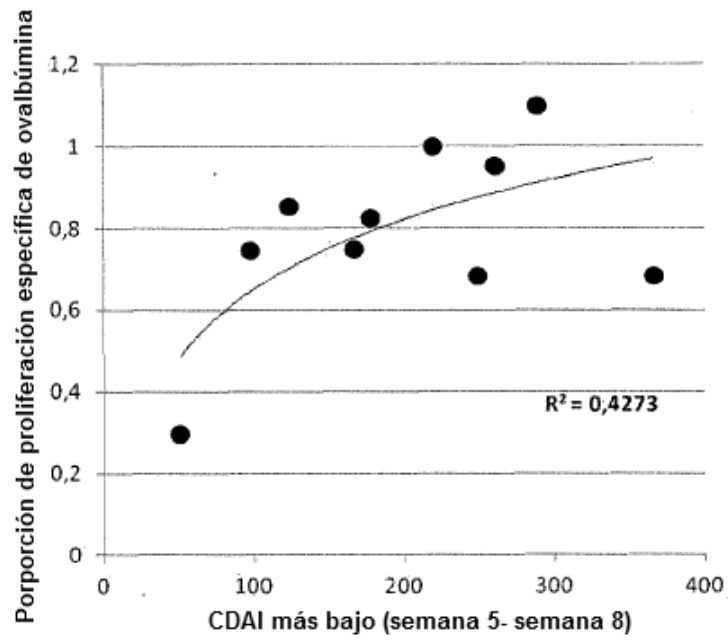


Figura 3

A



B

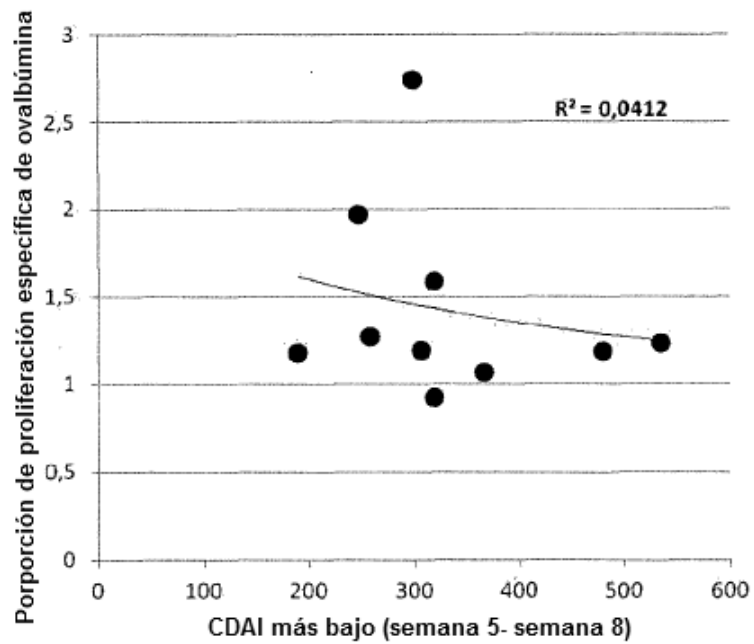


Figura 4

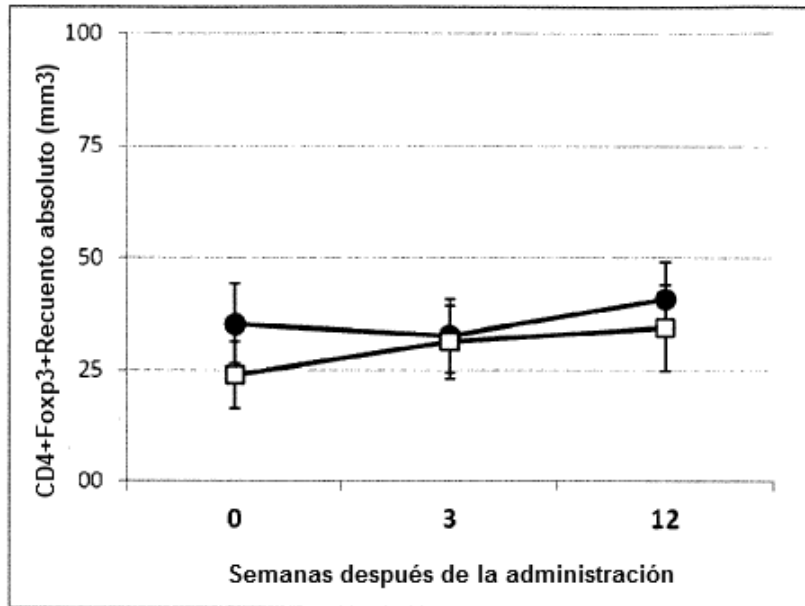


Figura 5